

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 99–102, März 1971

Quantitative Bestimmung von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen im Urin mit Ionenaustauschchromatographie-Fertigsäulen

Von M. DOSS und A. SCHMIDT

Abteilung für Klinische Biochemie, Hygiene-Institut der Philipps-Universität Marburg

(Eingegangen am 30. November 1970)

Mit einer kommerziellen Ionenaustauschchromatographie-Doppelsäule wurden δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen im Urin bestimmt. Die Modifikation ist dem von MAUZERALL und GRANICK eingeführten Verfahren an Spezifität, Empfindlichkeit, Richtigkeit und Präzision nicht unterlegen. Ihr Vorteil besteht in der einfachen praktischen Durchführbarkeit. Normalwerte wurden in einer Stichprobe von 87 gesunden Probanden bestimmt: δ -Aminolävulinsäure ($\log \bar{x} \pm s$) $2867 \pm 1562 \mu\text{g/l}$; Porphobilinogen ($\bar{x} \pm s$) $795 \pm 402 \mu\text{g/l}$. Die Verteilung von δ -Aminolävulinsäure im Urin weist einen log-normalen Typ auf. Die Methode wird zur quantitativen Analyse von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen in der Diagnostik und Differenzierung von Porphyrinen eingesetzt.

Quantitative determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine by the aid of ready-made ion exchange chromatographic columns

Assays of urinary δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen were made using commercial disposable dual ion-exchange columns in tandem. The specificity, sensitivity, accuracy, and precision of this modification compares favorably with that of the method of MAUZERALL and GRANICK; its advantage lies in its simple, practical application.

Norm values were determined for a group of 87 randomly selected, healthy control persons: δ -aminolevulinic acid ($\log \bar{x} \pm s$) $2867 \pm 1562 \mu\text{g/l}$; porphobilinogen ($\bar{x} \pm s$) $795 \pm 402 \mu\text{g/l}$. The values for δ -aminolevulinic acid in the urine conformed to a log-normal distribution. The method is suitable for quantitative analysis of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen for diagnostic purposes and for the differentiation of porphyrias.

Zur spezifischen Bestimmung von Aminoketonen und Porphobilinogen im Urin hat sich die von MAUZERALL und GRANICK (1) entwickelte Methode bewährt. Sie beruht auf dem Prinzip der Isolierung der ausgeschiedenen Metabolite durch zwei Ionenaustauschchromatographie-Säulen, die miteinander kombiniert sind. Der Urin passiert beide Säulen. Die obere, anionische Säule (Dowex 2) hält Porphobilinogen zurück, während die untere, kationische Säule (Dowex 50) δ -Aminolävulinsäure aus dem Urin adsorbiert. Harnstoff wird mit Wasser aus beiden Säulen entfernt. Aus den getrennten Säulen werden δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen eluiert. δ -Aminolävulinsäure wird mit Acetylacetone zu 2-Methyl-3-acetyl-4-(3-propionsäure)-pyrrol kondensiert. Die Monopyrrole bilden mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in saurer Lösung (EHRICH's Reagenz (1)) einen Farbkomplex, der spektrophotometrisch gemessen wird. Die Methode liefert reproduzierbare Ergebnisse. Der Nachteil für das klinisch-chemische Routinelaboratorium besteht in der praktischen Durchführbarkeit: Aufstellen, Packen, Vorbereiten und Regenerieren der Säulen sind zeitraubend; Schwierigkeitsgrad und Störanfälligkeit der Methode erfordern erfahrenes Personal.

DAVIS und ANDELMANN (2) haben die MAUZERALL-GRANICK-Methode mit Hilfe von Fertigsäulen für die Bestimmung der δ -Aminolävulinsäure im Urin bei Bleiintoxikation modifiziert. Dabei wird Porphobilinogen nicht berücksichtigt. CASTROW (3) verwendet hingegen allein die Anionenaustauscher-Säule (Dowex 1) für einen

Screeningtest auf Porphobilinogen. Mit beiden Verfahren (2, 3) soll geprüft werden, ob mit einer nach dem Prinzip von MAUZERALL und GRANICK hergestellten Fertig-Doppelsäule (2) quantitative Bestimmungen nicht nur von δ -Aminolävulinsäure, sondern auch von Porphobilinogen durchgeführt werden können. Das Ziel der Untersuchung besteht im Einsatz einer einfachen Modifikation mit den Vorteilen der Spezifität und Empfindlichkeit der Originalmethode (1) in der Porphyriediagnostik, insbesondere auch zur Diagnose und biochemischen Verlaufsbeobachtung der akuten intermittierenden Porphyrie in den klinisch latenten Phasen.

Material und Methoden

Untersuchungsgut

Zur Untersuchung gelangten tagsüber gesammelte Urinproben klinisch gesunder Personen (Personal des Hygiene-Instituts und Medizinaluntersuchungsamtes, Studenten). Aus den Altersgruppen 16–25, 26–35, 36–... 65 waren mindestens 14 Probanden vertreten. Die Urinproben wurden in lichtgeschützten Gefäßen gesammelt, damit sie für parallele Bestimmungen der Porphyrine verwendet werden konnten. Die Proben wurden auf pH 5–7 eingestellt und bis zur Analyse bei -20° aufbewahrt (4).

Reagenzien

Die fertigen Ionenaustauschharz-Chromatographie-Doppelsäulen wurden von Bio-Rad Laboratories („ALA-Doppelsäulen“ mit Reagenziensatz, Kat.-Nr. 95004), München, bezogen. Die anionische (obere) Säule enthält AG 1-X8 (CH_3COO^-), 100–200 mesh, die kationische (untere) Säule ist mit AG 50W-X4(H^+), 100–200 mesh, gefüllt. (Die numerischen Bezeichnungen entsprechen den Dowex-Harzen.) Aufbewahrung der Säulen erfolgte bei $+4^\circ$. Essigsäure 100% p. a. (Merck 90063),

1M Essigsäure,
0,2M Essigsäure,
Perchlorsäure 70proz. p. a. (Merck 519),
4-Dimethylaminobenzaldehyd p. a. (Merck 3058),
1M Natriumacetatlösung.

EHRICH's Reagenzlösung wird frisch angesetzt und ist 6 Stdn. haltbar: 3 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd p. a. werden in 90 ml Essigsäure und 24 ml Perchlorsäure gelöst; die Lösung wird mit Essigsäure auf 150 ml verdünnt (2). Die Reagenzlösung reicht für 12 δ -Aminolävulinsäure- und Porphobilinogen-Bestimmungen.

Geräte

Arbeitsgestell (Bio-Rad, Kat.-Nr. 95 502), Reagenzgläser 20 \times 180 mm (Schott Nr. 26 110 28), Spektralphotometer.

Vergleichssubstanzen

δ -Aminolävulinsäure-Stammlösung von Bio-Rad (unter Kat.-Nr. 95 004); δ -Aminolävulinsäure-HCl von Roth (Lager-Nr. 1-3118) bzw. von Fluka (Kat.-N. 08340). δ -Aminolävulinsäure wurde in 1M Na-acetatpuffer pH 4,6 gelöst.

Eichkurven für Porphobilinogen wurden sowohl mit einem biologisch als auch mit einem synthetisch gewonnenen Präparat angelegt. Porphobilinogen aus Zellsuspensionen von *Propionibacterium shermanii* (5) stellte freundlicherweise Herr Dr. G. MÜLLER, Isotopenlaboratorium der Abteilung für Chemie, Geologie und Biologie der Universität Stuttgart, zur Verfügung. Synthetisches Porphobilinogen bezogen wir von Protex Research, P. O. Box 1205, Montreal 201, P. Québec, Canada. Porphobilinogen wurde in 0,5M NH_4OH gelöst.

Arbeitsvorschrift

Isolierung von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen

Doppelsäule in das Arbeitsgestell plazieren und eingefülltes Wasser durchlaufen lassen. 0,5 ml Urin auf die Säuleneinheit pipettieren. Säuleneinheit dreimal mit je 10 ml dest. Wasser waschen. Säulen trennen und jede in ein Reagenzglas (s. o.) einsetzen. Aus der oberen Säule (Anionenaustauscher) Porphobilinogen mit 2 ml 1M und 2 ml 0,2M Essigsäure eluieren.

Aus der unteren Säule (Kationenaustauscher) δ -Aminolävulinsäure mit 7 ml 1M Na-acetatpuffer eluieren: zuerst 5 ml durchlaufen lassen, dann 2 ml aufgeben.

Bildung der Farbverbindung für die kolorimetrische Analyse

Dem δ -Aminolävulinsäure-Eluat 0,2 ml Acetylaceton zur Pyrrol-kondensation zufügen; Reagenzgläser mit einem Glashut bedecken und für 10 Min. in ein siedendes Wasserbad stellen; danach abkühlen auf Raumtemperatur und 7 ml EHRICH's Reagenzlösung hinzufügen.

Dem Porphobilinogen-Eluat 4 ml EHRICH's Reagenzlösung hinzufügen. Messung von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen nach 15 Min. bei 553 nm gegen einen Reagenzienleerwert aus 1M Na-acetat und Acetylaceton bzw. 1M Essigsäure plus EHRICH's Reagenz 1:1 (v/v).

Berechnung

Aus Eichkurven resultierten folgende Faktoren:

$$\delta\text{-Aminolävulinsäure } (\mu\text{g/ml}) = E_{553}^{1\text{cm}} \times 70$$

$$\text{Porphobilinogen } (\mu\text{g/ml}) = E_{553}^{1\text{cm}} \times 88$$

Störfaktoren

1. Längeres Stehen des eluierten Porphobilinogens und des zum Pyrrol zyklisierten EHRICH's-Aldehyd-Komplexes, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei +4°, führt zu Verlusten (etwa 10% in 6 Stdn.).
2. Die Zeit von 10 Minuten zur Kondensation von δ -Aminolävulinsäure zum Pyrrol ist einzuhalten, da bei längerem Erhitzen Pyrrole miteinander zyklisieren.
3. Der Pyrrol-EHRICH's-Aldehyd-Farbkomplex ist nicht stabil. Seine optische Dichte nimmt nach 15 Min. linear ab (gemessen bis 100 Min.): 3,5% in 10 Min. bei Raumtemperatur.

Ergebnisse

Spezifität

Durch die Isolierung von Aminoketonen (δ -Aminolävulinsäure und Aminoaceton) und Porphobilinogen mit Ionenaustauschchromatographiesäulen (1) ist die Methode für die Bestimmung der Metabolite spezifisch (Abb. 1).

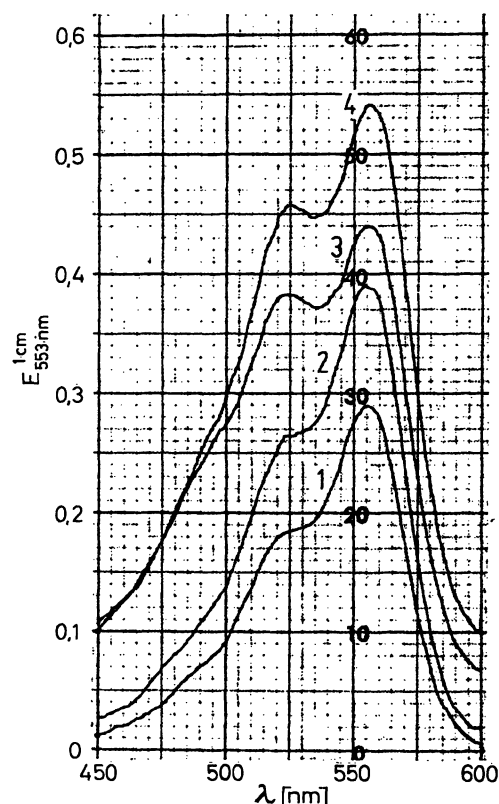


Abb. 1

Spektren der Farbkomplexe von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen mit EHRICH's Reagenz. 1 δ -Aminolävulinsäure Vergleichssubstanz 2 δ -Aminolävulinsäure aus Urin (akute intermittierende Porphyrie) nach Chromatographie 3 Porphobilinogen aus Urin wie bei 2 4 Porphobilinogen Vergleichssubstanz. 1 und 4 wurden mit der Eichlösung hergestellt. Der Urin enthielt 39 mg/l δ -Aminolävulinsäure und 27 mg/l Porphobilinogen

Eichgerade und molarer Extinktionskoeffizient

Die optische Dichte verhält sich gegenüber der Konzentration bis $E = 0,8$ linear, d. h. es können bis 56 mg δ -Aminolävulinsäure/l und 70 mg Porphobilinogen/l bestimmt werden. Die Angabe des linearen Verlaufs der Eichkurve bis 0,8 beruht auf Messungen der Metabolite im Urin einer Patientin mit akuter intermittierender Porphyrie. Mit Reinsubstanzen verlaufen die Konzentrationskurven bis $E = 1,2$ mit und ohne Chromatographie linear. Unter den angegebenen Bedingungen liegt die molare Extinktion von δ -Aminolävulinsäure bei $12,1 \times 10^4$ und diejenige von Porphobilinogen bei $5,6 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

Richtigkeit

Vergleichende Bestimmungen von δ -Aminolävulinsäure zwischen 10 und 40 μg ohne und mit Ionenaustauschchromatographie ergaben eine Wiederfindung von 83% durch die Säule ($r = 0,999$, Anzahl der Paare = 6). Porphobilinogen zwischen 10 und 50 μg wurde zu 87% wiedergefunden ($r = 0,997$, $n = 6$).

Zusatz von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen (je 1 und 10 μg) zu Urin ergab eine Wiederauffindungsrate von 97% bzw. 90%.

Die Verluste sind in der Berechnung der Faktoren berücksichtigt.

Präzision

Zur Untersuchung der Präzision wurde ein Normalurin (in der Serie) und ein Urin von einer Patientin mit akuter intermittierender Porphyrie (von Tag zu Tag) verwendet.

δ -Aminolävulinsäure:

- In der Serie ($n = 10$),
 $\bar{x} \pm s = 5\,276 \pm 258 \mu\text{g/l}$, $V\% = 4,9$.
- Von Tag zu Tag ($n = 10$),
 $\bar{x} \pm s = 28\,327 \pm 988 \mu\text{g/l}$, $V\% = 3,5$.

Porphobilinogen:

- In der Serie ($n = 10$),
 $\bar{x} \pm s = 1\,649 \pm 120 \mu\text{g/l}$, $V\% = 7,3$.
- Von Tag zu Tag ($n = 10$),
 $\bar{x} \pm s = 39\,141 \pm 1027 \mu\text{g/l}$, $V\% = 2,6$.

Empfindlichkeit

- Nach der Berechnung aus Analysen zur Aufstellung der Faktoren:
 δ -Aminolävulinsäure $342 \mu\text{g/l}$ (2s),
Porphobilinogen $582 \mu\text{g/l}$ (2s)
- Nach den Daten der Präzision in der Serie:
 δ -Aminolävulinsäure $500 \mu\text{g/l}$ (2s),
Porphobilinogen $240 \mu\text{g/l}$ (2s)
- Nach praktischen Erfahrungen bei Messungen mit 2 cm-Küvetten in der Transmissionsskala:
 δ -Aminolävulinsäure $250 \mu\text{g/l}$,
Porphobilinogen $200 \mu\text{g/l}$.

Bei einer Probeneingabe von 1 ml Urin können noch etwa 100 $\mu\text{g/l}$ eines jeden Metaboliten gemessen werden.

Normalwerte

Die Stichprobe umfaßt 87 Personen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die geometrische

Tab. 1
Normalwerte von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen im Urin

	n	δ -Aminolävulinsäure ($\mu\text{g/l}$) $\log \bar{x} \pm s$	Porphobilinogen ($\mu\text{g/l}$) $\bar{x} \pm s$
Stichprobe	87	2867 ± 1562	795 ± 402
Männer	43	3018 ± 1559	803 ± 403
Frauen	44	2717 ± 1528	785 ± 424

Auswertung der Normalwerte zeigte, daß δ -Aminolävulinsäure im Urin in einer log-normalen Verteilung vorliegt. Der 95%-Bereich für δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen aus der Berechnung von $\log \bar{x}$ bzw. $\bar{x} \pm 2s$ stimmt mit den aus der graphischen Darstellung der kumulativen Häufigkeit ermittelten Resultaten überein.

Diskussion

Die mit kommerziell verfügbaren Ionenaustausch-Doppelsäulen modifizierte Bestimmung von δ -Aminolävulinsäure (2) und Porphobilinogen ist an Spezifität, Richtigkeit, Präzision und Empfindlichkeit dem Originalverfahren (1) nicht unterlegen. Ihre Vorteile liegen in der technisch einfachen Durchführbarkeit. Mit der parallelen quantitativen Analyse von Porphobilinogen erfüllt die Methode die Ansprüche, die zur Diagnostik und Differentialdiagnostik der Porphyrien an sie zu stellen sind. Die Methode ist automatisierbar.

Der relativ hohe Variabilitätskoeffizient von 7,3% bei der Präzision in den Porphobilinogen-Analysen unter Vergleichsbedingungen wird darauf zurückgeführt, daß die gemessenen Extinktionen unter 0,02 bei $d = 1 \text{ cm}$ in der nicht-gedehnten Skala lagen. Der Variabilitätskoeffizient in der Präzision von Tag zu Tag liegt deshalb niedriger als derjenige in den Serienbestimmungen, da als Probenstandard Urin von einer Patientin mit akuter intermittierender Porphyrie mit hohen Konzentrationen von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen verwendet wurde (Abb. 1). Die Richtigkeit ist eine Funktion des Nachweises des Spektrums.

Mittelwert und Bereich der Normalwerte stimmen mit den von HAEGGER-ARONSON gefundenen Daten (δ -Aminolävulinsäure $2,9 \pm 1,4$, 95%-Bereich 0,1 bis 5,7 mg/l; Porphobilinogen $1,0 \pm 0,5$, 95% 0 bis 2,0) überein (6). In der Stichprobe (Tab. 1) haben etwa 3% der Probanden eine δ -Aminolävulinsäure-Ausscheidung über 6 mg/l (obere Grenze 6,5 mg/l) und eine Porphobilinogen-Ausscheidung über 1,6 mg/l (obere Grenze 2,0 mg/l). Nach klinischen und klinisch-chemischen Befunden sind die Probanden gesund; Alkoholabusus und Leberschaden bestanden zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht. Insofern kommt diesen gering erhöhten Werten hier keine pathologische Bedeutung zu. Bei drei Personen (2 ♂, 1 ♀) im Alter von 18 bis 21 Jahren fanden wir eine δ -Aminolävulinsäure-Ausscheidung zwischen 6500 und 8140 $\mu\text{g/l}$; diese Resultate wurden der Stichprobe nicht zugeordnet. Bei einem der Probanden bestand ein Alkoholkonsum von mindestens 100 g/Tag; unter Abstinenz ging die Ausscheidung auf 3100 $\mu\text{g/l}$ zurück. Bei den übrigen beiden Personen blieb die Pathogenese ungeklärt. Die drei Personen hatten gleichzeitig eine symptomatische (sekundäre) Koproporphyrinurie zwischen 150 und 400 $\mu\text{g/l}$.

WITH (7) wie HAEGGER-ARONSON (6) fanden, daß etwa 1% der von ihnen untersuchten Kontrollpersonen über 6 mg/l δ -Aminolävulinsäure ausscheiden. Eine bimodale Verteilung der Konzentration von δ -Aminolävulinsäure (7) stellten wir nicht fest. Bei der graphischen Darstellung (8) der Resultate zeigte sich, daß δ -Aminolävulinsäure im Urin log-normal verteilt ist. Die Höhe der δ -Aminolävulinsäure-Ausscheidung korrelierte nicht mit derjenigen von Porphobilinogen im Normalurin. δ -Aminolävulinsäure-Konzentrationen im oberen Normalbereich sind häufig gepaart mit Porphobilinogen-Konzentrationen im mittleren bis unteren Normalbereich.

Auch für unsere Analysen trifft zu, daß sich bei niedrigen Konzentrationen von Porphobilinogen das charakteristische Spektrum des Porphobilinogen-EHRlich's-Aldehyd-Komplexes nicht immer sichern ließ. LAURIAUX und Mitarbeiter (9) haben deshalb eine Korrektur nach ALLEN (10) durch Messung des Farbkomplexes an verschiedenen Wellenlängen vorgeschlagen. Damit erhält man niedrigere Werte für Porphobilinogen. Das Problem besteht für den Normalbereich. In solchen Proben hingegen, in denen das Spektrum (Abb. 1) erkannt werden kann, korreliert die Absorption bei 553 nm mit der Konzentration. Deshalb ist die ALLEN-Korrektur ohne pathognomonische diagnostische Signifikanz. Ihre Anwendung auf die Bestimmungsmethode für das klinisch-chemische Routinelaboratorium wird nicht empfohlen.

MARVER und Mitarbeiter (11, 12) haben gefunden, daß im Normalurin Aminoacetone in ähnlichen Mengen wie δ -Aminolävulinsäure vorkommt. Die MAUZERALL-GRANICK-Methode und davon ausgehende Modifikationen gestatten jedoch keine Differenzierung zwischen δ -Aminolävulinsäure und Aminoacetone. Dieser Nachteil hat insofern keine praktischen diagnostischen Konsequenzen, da von Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie nur δ -Aminolävulinsäure in erhöhten Konzentrationen ausgeschieden wird (11, 12), nicht hingegen Aminoacetone. Die Exkretion von Aminoacetone bei Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie wies im Vergleich mit anderen Patienten, die nicht an dieser hepatischen Porphyrie erkrankt waren, keine signifikanten Unterschiede auf (11, 12).

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

1. MAUZERALL, D. und S. GRANICK, J. biol. Chemistry 219, 435 (1956). — 2. DAVIS, J. R. und S. L. ANDELMANN, Arch. Environ. Health 15, 53 (1967). — 3. CASTROW II, F. F., Cutis (New York) 4, 695 (1968). — 4. BOSSENMAIER, I. und R. CARDINAL, Clin. Chem. (New York) 14, 610 (1968). — 5. MÜLLER, G. und G. BEZOLD, Z. Naturforsch. 24b, 47 (1969). — 6. HAEGER-ARONSON, B., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 12, Suppl. 47, 1 (1960). — 7. WITH, T. K., Clin. Biochem. (Canada) 1, 224 (1968). — 8. Doss, M. und U. BODE, diese Z. 6, 383 (1968). — 9. LORIAUX, L., S. DELENA und H. BROWN, Clin. Chem. (New York) 14, 292 (1969). — 10. ALLEN, W. M., J. Clin. Endocr. (Springfield) 10, 71 (1950). — 11. MARVER, H. S., D. P. TSCHUDY, M. G. PERLROTH, A. COLLINS und G. HUNTER jr., Analytic. Biochem. (New York) 14, 53 (1966). — 12. TSCHUDY, D. P., F. H. WELLAND, A. COLLINS und G. HUNTER, Lancet (London) 1963/II, 660.

Priv.-Doz. Dr. Manfred Doss
D-355 Marburg a. d. Lahn
Pilgrimstein 2